# 基于外周血细胞因子和淋巴细胞表达特征对川崎病发生冠脉损伤影响因素分析

刘露[1, 2]，樊建春[1]，张英谦[2]

（1.河北北方学院研究生学院，河北 张家口 075000 ；2.河北省儿童医院心内科，河北省小儿心血管重点实验室，河北 石家庄 050031）

**摘要** **目的** 观察川崎病（Kawasaki disease，KD）患儿外周血细胞因子和淋巴细胞的表达特征并分析冠脉损伤相关的影响因素。**方法** 收集 2021 年 8 月至 2022 年 10 月河北省儿童医院心内科收治的 KD 患儿 50 例，选择同期单纯发热患儿（除外 KD）46 例为发热对照（FC）组，54 例正常体检患儿为正常对照（NC）组。检测三组患儿外周血细胞因子及淋巴细胞的表达水平，二元 Logistic 回归分析 KD 组与 FC 组及冠状动脉损伤（coronary artery lesions，CAL）组与无冠状动脉损伤（NCAL）组组间差异性指标，并绘制受试者工作特征曲线（ROC）。**结果** 1.KD 组中 IL-4、IL-6、IL-10、IL-5、IL-8 水平高于 FC 组，IL-4、IL-6、IL-10、TNF-α、IFN-γ、IL-1β、IL-5、IL-12p70、IFN-α、IL-8 水平高于 NC 组；CAL 组中 IL-4、IL-1β水平高于 NCAL 组，而 IL-6 水平降低，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。2.KD 组 $CD4^+T$ 细胞和总 B 细胞高于 FC 组，而总 T 细胞和 $CD8^+T$ 细胞占比较低；KD 组总 B 细胞高于 NC 组，而 $CD8^+T$ 细胞和 NK 细胞占比降低。CAL 组 NK 细胞高于 NCAL 组，而 $CD8^+T$ 细胞占比降低，均有统计学差异（$P<0.05$）。3.二元 Logistic 回归显示：（1）IL-6 升高是 KD 发生的独立危险因素，OR 值及 95%置信区间（95%CI）为 1.071（1.019,1.126）；（2）$CD8^+T$ 细胞和 NK 细胞是 CAL 的独立危险因素，OR 值及 95%CI 分别为 0.750（0.611,0.921）、1.652（1.192,2.289），二者联合预测 CAL 的灵敏度为 81.25%，特异度为 94.12%，约登指数为 0.75，AUC 为 0.901，95%CI 为（0.783,0.967）。**结论** IL-6 升高是 KD 发生的高危因素，$CD8^+T$ 细胞降低和 NK 细胞升高对 KD 患儿发生 CAL 有一定的预测价值。

**关键词** 川崎病；细胞因子；淋巴细胞；冠状动脉损伤

# Analysis of influencing factors of coronary artery lesions in Kawasaki disease based on the expression characteristics of cytokines and lymphocytes in peripheral blood

LIU Lu[1,2]，FAN Jianchun[1]，ZHANG Ying-qian[2]

（1.Graduate School of Hebei North University, Zhangjiakou, 075000, Hebei, China；

[1] 基金项目：河北省自然科学基金（H2021316005）

[2] 通讯作者：张英谦。E-mail：zhangyingqian666@163.com

2. Cardiovascular Department, Children's Hospital of Hebei Province, Hebei Provincial Key Laboratory of Pediatric Cardiovascular Disease, Shijiazhuang, 050031,Hebei, China）

**Abstract Objective** To observe the expression characteristics of peripheral blood cytokines and lymphocytes in children with Kawasaki disease (KD) and analyze influencing factors related to coronary artery lesions. **Methods** A total of 50 children with KD who were admitted to the Department of Cardiology of Children's Hospital of Hebei Province from August 2021 to October 2022 were collected. 46 children with simple fever (excluding KD) during the same period were selected as the febrile control (FC) group, and 54 children with normal physical examination were selected. Children were the normal control (NC) group. The expression levels of cytokines and lymphocytes in the peripheral blood of the three groups were detected, and binary Logistic regression analysis was used to analyze the differences between the KD group and the FC group, as well as between the coronary artery lesion(CAL) group and the non-coronary artery lesions (NCAL) group, the receiver operating characteristic curve(ROC) was drawn. **Results** 1. The levels of IL-4, IL-6, IL-10, IL-5, and IL-8 in the KD group were higher than those in the FC group, and the levels of IL-4, IL-6, IL-10, TNF-α, and IFN-γ, IL-1β, IL-5, IL-12p70, IFN-α, and IL-8 levels were higher than those in the NC group; the levels of IL-4 and IL-1β in the CAL group were higher than those in the NCAL group, while the levels of IL-6 were lower. Both were statistically significant ($P<0.05$). 2. CD4+T cells and total B cells in the KD group were higher than those in the FC group, while the proportions of total T cells and CD8+T cells were lower; the total B cells in the KD group were higher than those in the NC group, while the proportions of CD8+T cells and NK cells were higher than those in the NC group reduce. NK cells in the CAL group were higher than those in the NCAL group, while the proportion of CD8+ T cells was lower, with statistical differences ($P<0.05$). 3. Binary Logistic regression showed: (1) Elevation of IL-6 was an independent risk factor for KD, the OR value and 95% confidence interval (95%CI) were 1.071 (1.019, 1.126); (2) CD8+T Cells and NK cells are independent risk factors for CAL, and the OR value and 95%CI are 0.750 (0.611, 0.921) and 1.652 (1.192, 2.289), respectively. Youden index was 0.75, AUC was 0.901, and 95%CI was (0.783, 0.967). **Conclusion** Elevation of IL-6 is a high-risk factor for the occurrence of KD, and the decrease of CD8+T cells and the increase of NK cells have certain predictive value for the occurrence of CAL in children with KD.

**Key Words**：Kawasaki Disease；Cytokines；Lymphocyte；Coronary artery lesions

KD 是一种病因不明的急性发热性疾病，5 岁以下的儿童容易罹患。该病主要累及全身中小血管，CAL 是本病最严重的并发症，包括冠状动脉扩张、冠状动脉瘤（CAA）等。CAL 也成为儿童获得性心脏病的主要原因[1]。目前对早期诊断 KD 缺乏特异性实验室检查，使其与单纯发热性疾病鉴别较为困难，易延误患儿治疗，致使患儿发生 CAL 的风险显著升高。当前 CAL 的诊断多依赖于超声心动图，超声心动图可通过检测冠脉内径计算 Z 值判别冠脉损伤程度，受地域、种族、群体差异等多种因素影响，目前国内外计算 Z 值的方法尚未统一[2]。超声心动图也不能早期预测 CAL 的发生，同时当前也缺乏早期预测 CAL 发生的实验室指标。良好的实验室指标可能会为早期预测 CAL 奠定理论基础，有利于提醒临床医生及早干预降低患儿 CAL 的发生。本研究分析了炎症细胞因子及淋巴免疫细胞在 KD 和发热患儿中的表达特征及其与 CAL 发生的关系，旨在为 KD 患儿早期临床诊断及预测 CAL 的发生提供依据。

## 1　材料与方法

### 1.1 一般资料

#### 1.1　1 研究对象

2021 年 8 月至 2022 年 10 月在河北省儿童医院心内科住院 KD 患儿 50 例（KD 组），KD 诊断依据美国心脏心脏协会（AHA）的《川崎病诊断声明和指南》。选取除外 KD 的发热患儿 46 例作为发热对照组（FC 组），正常体检患儿 54 名作为正常对照组（NC 组）。在静脉注射免疫球蛋白前行冠状动脉超声检查，根据 Z 值判断有无 CAL 将 KD 患儿分为 CAL 组和 NCAL 组。Z 值≥2 但＜2.5 定义为仅扩张，小动脉瘤定义为 Z 值≥2.5 但＜5，中型动脉瘤的 Z 值≥5 但＜10 且管腔绝对内径＜8mm，大型和巨型动脉瘤(Z 评分≥10 或绝对直径≥8 mm)。本研究经过河北省儿童医院伦理审查委员会的批准。表 1 是研究对象的基线资料。

**表 1　研究对象的基线特征**

| | KD 组 | FC 组 | NC 组 | P 值 |
|---|---|---|---|---|
| 例数（n） | 50 | 46 | 54 | |
| 性别（男/女） | 32/18 | 29/17 | 43/11 | 0.121 |
| 年龄（岁） | 3（2.67,3.75） | 5（4.76,7.33） | 5（4.75,6.17） | **0.001** |
| BMI（kg/cm$^2$） | 16.80±0.66 | 15.74±0.97 | 15.25±0.6 | **0.000** |

注：BMI：身体质量指数，P＜0.05 有统计学差异，P＞0.05 无统计学意义，有可比性

### 1.1.2 KD 患儿纳入和排除标准

纳入标准：①符合 AHA 的川崎病及冠状动脉损伤诊断标准；②首次发病；③入院前未接受丙种球蛋白和激素等药物治疗；④根据《赫尔辛基宣言》的规定，所有受试者的父母都知情同意。排除标准：①非 KD 为病因的发热性疾病；②临床资料不完整。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 标本采集

早晨空腹采集外周静脉血 2ml，于 EDTA 抗凝管储存，对血标本进行离心处理（1780xg，10min），分离 0.5ml 血浆并储存在-80℃冰箱备用；留剩余血样留于 4℃冰箱用于淋巴细胞检测。

### 1.2.2 外周血细胞因子和 淋巴细胞分析

采用流式多因子检测技术（CBA 法）检测血清细胞因子（IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、TNF-α、IFN-γ、IL-17A、IL-1β、IL-5、IL-12p70、IFN-α、IL-8）的浓度，细胞因子联合检测试剂盒购于江西赛基生物技术公司，并使用 BD FACSCanto Ⅱ系统对数据进行分析，所有步骤都是严格按照制造商说明进行。在生成每种细胞因子的标准曲线后，通过使用标准曲线的线性部分，从平均荧光强度换算出每个孔中每种细胞因子的浓度。流式细胞术检测外周血淋巴细胞 $CD3^{+}$、$CD4^{+}$、$CD8^{+}$、$CD3^{+}CD4^{-}CD8^{-}$、$CD21^{+}$和 $CD16^{+}CD56^{+}$的表达水平，流式细胞仪购于美国 Bechman 公司。

### 1.2.3 观察指标

比较 KD 组、FC 组和 NC 组三组间炎症细胞因子和淋巴细胞的表达，进一步比较 KD 患儿中 CAL 组和 NCAL 组间炎症细胞因子和淋巴细胞的水平，分析各组间炎症因子与淋巴细胞的差异。

## 1.3 统计学分析

采用 SPSS 25.0 统计学软件进行数据分析，并用 Medcalc15.0 绘制 ROC 曲线图。以双侧检验 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。符合正态分布的计量资料以均数±标准差( $\bar{x}$ ±s)描述，两组间比较采用独立样本 t 检验，非正态分布的计量资料以中位数和四分位间距[M(Q1,Q3)]描述，两组间比较采 Mann-Whitney U 秩和检验，将筛选出的变量纳入二元 Logistic 回归模型中进行是否损伤影响因素分析，通过 ROC 曲线下面积 AUC、灵敏度、特异度对模型进行评估。

# 2 结果

### 2.1 一般实验室检查指标结果

**表 2 一般实验室指标检查结果**

| | KD 组 | FC 组 | HC 组 | P 值 |
|---|---|---|---|---|
| CRP（mg/L） | 61.43±5.86 | 22.52±4.38 | 7.27±3.65 | **0.000** |
| SAA（μg/L） | 240.95±30.61 | 124.41±34.51 | 4.37±1.08 | **0.003** |
| PCT（%） | 0.46±0.10 | 0.32±0.11 | 0.30±0.08 | **0.000** |
| PCT（μg/L） | 1.04±0.24 | 0.37±0.09 | 0.08±0.01 | **0.010** |
| ESR（μg/L） | 73.16±3.63 | 34.30±5.07 | 18.12±5.03 | **0.000** |
| D-二聚体 | 1.96±0.28 | 2.48±1.55 | 0.65±0.24 | 0.456 |
| PLT | 412.44±14.24 | 346.76±18.12 | 305.98±11.19 | **0.000** |
| MPV | 9.26±0.95 | 9.20±0.51 | 9.81±1.09 | **0.004** |
| PDW | 12.18±3.08 | 13.44±3.31 | 11.48±2.64 | **0.006** |

注：CRP：C-反应蛋白，SAA：血清淀粉样蛋白，PCT（%）：血小板压积，PCT（μg/L）：降钙素原，ESR：血沉，PLT：血小板计数，MPV：平均血小板体积，PDW：血小板分布宽度

### 2.2 不同分组的炎症细胞因子水平

血清炎症细胞因子检测结果如表 3、图 1 中所示。与 FC 组相比，KD 组 IL-4、IL-6、IL-10、IL-5 和 IL-8 水平升高；HC 组与 KD 组相比，IL-4、IL-6、IL-10、TNF-α、IFN-γ、IL-17A、IL-1β、IL-5、IL-12p70、IFN-α、IL-8 的水平明显降低。此外，CAL 组与 NCAL 组相比，IL-4、IL-1β的水平显著升高，而 IL-6 的水平降低。此外，KD 合并 CAL 组中 IL-4 和 IL-1β的水平高于 NCAL 组，而 IL-6 的含量显著低于 NCAL 组，如表 4 和图 2 所示。

**表 3 三组血清炎症细胞因子水平**

| 细胞因子 | KD 组（n=50） | FC 组（n=46） | NC 组（n=54） | P 值 |
|---|---|---|---|---|
| IL-2 | 1.65（1.33,3.49） | 1.30（1.18,1.81） | 1.44（1.18，1.46） | 0.182 |
| IL-4 | 2.09（1.98,6.00）$^{aB}$ | 1.48（1.30,1.86）$^{b}$ | 1.17（1.04,1.35） | **0.000** |
| IL-6 | 44.35（75.16,166.69）$^{AB}$ | 4.05（5.66,12.18）$^{B}$ | 1.95（1.81,2.31） | **0.000** |
| IL-10 | 5.31（6.33,18.64）$^{AB}$ | 3.01（2.97,4.69） | 3.16（3.05,3.47） | **0.000** |
| TNF-α | 2.96（2.28,8.60）$^{B}$ | 2.47（2.27,3.02） | 2.29（1.94,2.56） | **0.019** |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| IFN-γ | 2.72（2.90,4.23）$^{B}$ | 3.03（1.09,14.85）$^{B}$ | 2.25（2.06,2.53） | **0.003** |
| IL-17A | 13.85（10.77,16.32）$^{b}$ | 13.33（10.00,14.55） | 9.23（7.19,11.06） | 0.058 |
| IL-1β | 2.11（2.32,12.32）$^{B}$ | 1.87（2.20,4.67）$^{B}$ | 0.58（0.59,1.02） | **0.000** |
| IL-5 | 1.64（1.78,3.78）$^{Ab}$ | 0.82（0.85,1.43）$^{b}$ | 1.25（1.16,1.46） | **0.000** |
| IL-12p70 | 3.19（-3.08,23.64）$^{B}$ | 2.54（2.20,3.93）$^{B}$ | 0.70（0.67,1.07） | **0.000** |
| IFN-α | 3.15（4.34,14.26）$^{B}$ | 2.00（2.65,6.96） | 1.87（1.79,2.77） | **0.032** |
| IL-8 | 11.68（11.04,23.89）$^{AB}$ | 3.91（4.61，9.94） | 3.44（3.56,4.95） | **0.000** |

注：值以例（n）或中位数（第 25-75 个百分位数）表示，加粗字体表示三组间的比较有统计学差异。

$^{a}$P＜0.05 VS FC 组，$^{b}$P＜0.05 VS HC 组；

$^{A}$P＜0.01 VS FC 组，$^{B}$P＜0.01 VS HC 组。



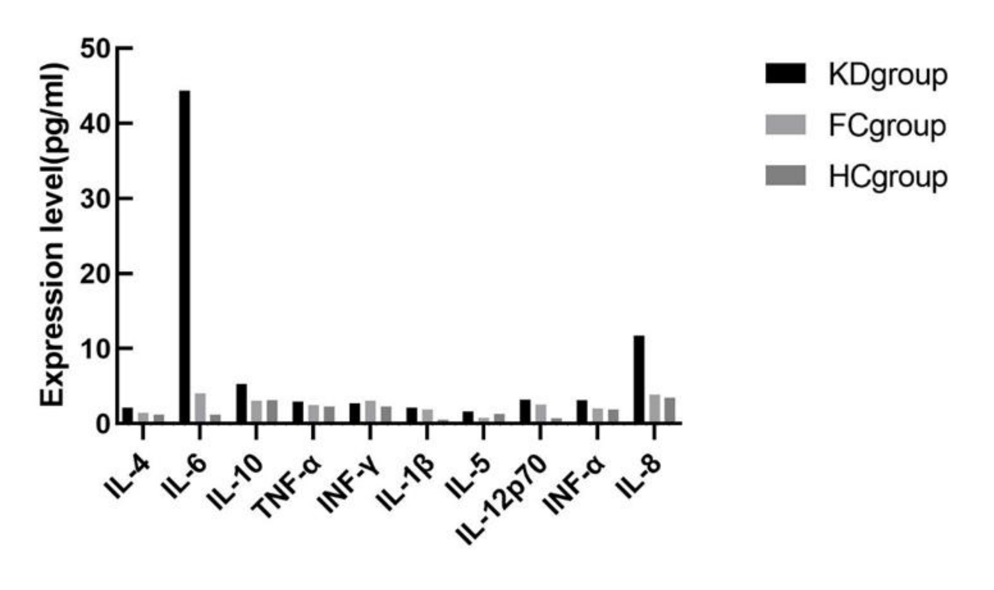



**图 1 三组间差异性细胞因子表达水平**

**表 4 CAL 组和 NCAL 组血清细胞因子水平**

| 细胞因子 | CAL 组（n=16） | NCAL 组（n=34） | P 值 |
|---|---|---|---|
| IL-2（pg/ml） | 1.85（1.31,3.15） | 1.61（0.94,4.06） | 0.506 |
| IL-4（pg/ml） | 2.68（2.15,3.85） | 1.72（1.49,7.41） | **0.009** |
| IL-6（pg/ml） | 14.31（12.59,119.83） | 79.17（84.48,208.87） | **0.04** |

| | | | |
|---|---|---|---|
| IL-10（pg/ml） | 4.45（3.40,7.00） | 7.93（7.00,24.84） | 0.056 |
| TNF-α（pg/ml） | 4.09（2.73,5.51） | 2.86（1.39,10.74） | 0.167 |
| IFN-γ（pg/ml） | 2.72（2.34,4.89） | 2.76（2.73,4.36） | 0.909 |
| IL-17A（pg/ml） | 13.57（8.93,18.13） | 14.16（9.93,17.17） | 1.000 |
| IL-1β（pg/ml） | 3.90（2.59,7.24） | 1.63（1.07,15.82） | **0.022** |
| IL-5（pg/ml） | 1.59（1.26,2.47） | 1.64（1.77,4.66） | 0.647 |
| IL-12p70（pg/ml） | 3.85（2.82,6.02） | 2.99（-6.87,32.93） | 0.151 |
| IFN-α（pg/ml） | 3.10（2.08,7.31） | 3.15（4.27,18.67） | 0.795 |
| IL-8（pg/ml） | 10.86（8.01,13.89） | 11.68（11.21,29.86） | 0.512 |

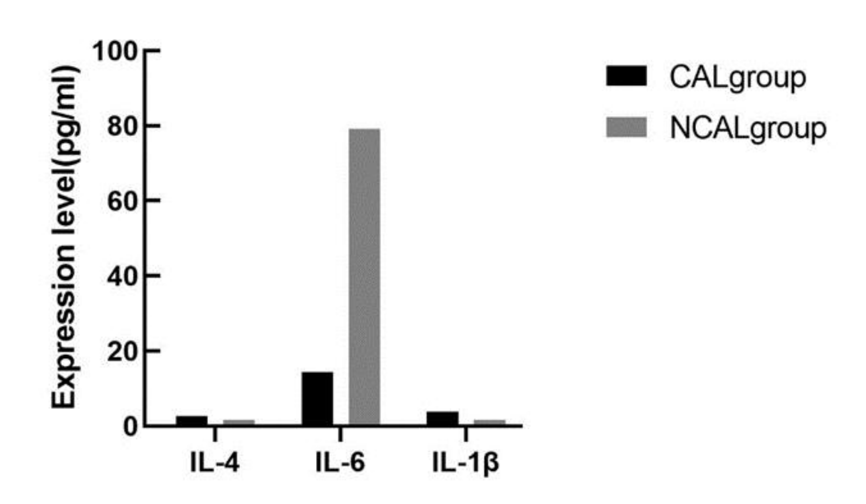



**图 2 CAL 组与 NCAL 组间差异性表达因子**

### 2.3 各个分组的淋巴细胞亚群比较

KD 组与 FC 组相比，CD4⁺T 细胞和总 B 细胞升高，总 T 细胞和 CD8⁺T 细胞降低，有统计学差异；与 KD 组相比，NC 组 CD8⁺T 细胞和 NK 细胞水平上升，而总 B 细胞水平下降，如表 5 及图 3 表示。另外，KD 患儿中 CAL 组的 CD8⁺T 细胞占比低于 NCAL 组，而 NK 细胞水平高于 NCAL 组，差异有统计学意义，如表 6 及图 4 所示。

**表 5 三组间免疫淋巴细胞亚群比较**

| | KD 组（n=50） | FC 组（n=46） | NC 组（n=54） | H 值 | P 值 |
|---|---|---|---|---|---|
| 总 T 细胞（%） | 64.20（62.45，67.81）a | 68.87（66.59，72.01） | 68.95（66.03，70.40） | 6.365 | **0.041** |
| CD4⁺T 细胞（%） | 39.71（37.43，42.88）a | 37.11（33.31，38.47） | 39.45（35.86,40.08） | 5.284 | 0.071 |
| CD8⁺T 细胞（%） | 17.52（16.41,20.27）AB | 25.06（23.01,25.12） | 22.85（22.22,25.12） | 25.813 | **0.000** |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| γδT 细胞（%） | 5.30（4.94,7.87） | 6.1（5.98,8.35） | 5.6（5.51,7.14） | 3.039 | 0.219 |
| 总 B 细胞（%） | 24.06（21.49，27.20）AB | 16.1（15.38,20.91） | 18.30（17.89,21.27） | 13.816 | **0.001** |
| NK 细胞（%） | 6.39（6.44,8.98）b | 9.13（7.71,10.46） | 8.95（8.38,11.41） | 4.650 | 0.098 |

注：值以例（n）或中位数（第 25-75 个百分位数）表示，加粗字体表示三组间的比较有统计学差异。[a]P＜0.05 VS FC 组，[b]P＜0.05 VS HC 组；[A]P＜0.01 VS FC 组，[B]P＜0.05VS HC 组。

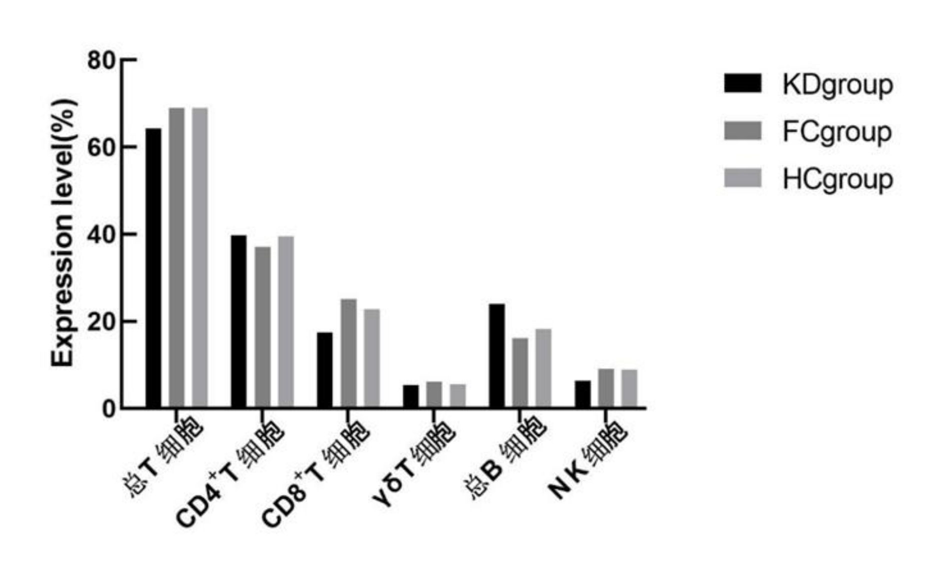



**图 3 三组间淋巴细胞表达水平**

**表 6 CAL 组与 NCAL 组淋巴细胞比较**

| 淋巴细胞 | CAL（n=15） | NCAL（n=35） | t 值/Z 值 | P 值 |
|---|---|---|---|---|
| 总 T 细胞（%） | 63.46±9.86 | 65.85±9.30 | -0.817 | 0.418 |
| $CD4^{+}T$ 细胞（%） | 41.00±12.08 | 41.00±12.08 | 0.403 | 0.689 |
| $CD8^{+}T$ 细胞（%） | 15.25±5.86 | 19.66±6.80 | -2.186 | **0.034** |
| γδT 细胞（%） | 5.90（2.92,10.86） | 5.30（4.78,7.63） | -0.159 | 0.874 |
| 总 B 细胞（%） | 23.07±10.40 | 24.89±9.99 | -0.583 | 0.563 |
| NK 细胞（%） | 10.31±5.31 | 6.59±3.59 | 2.895 | **0.006** |

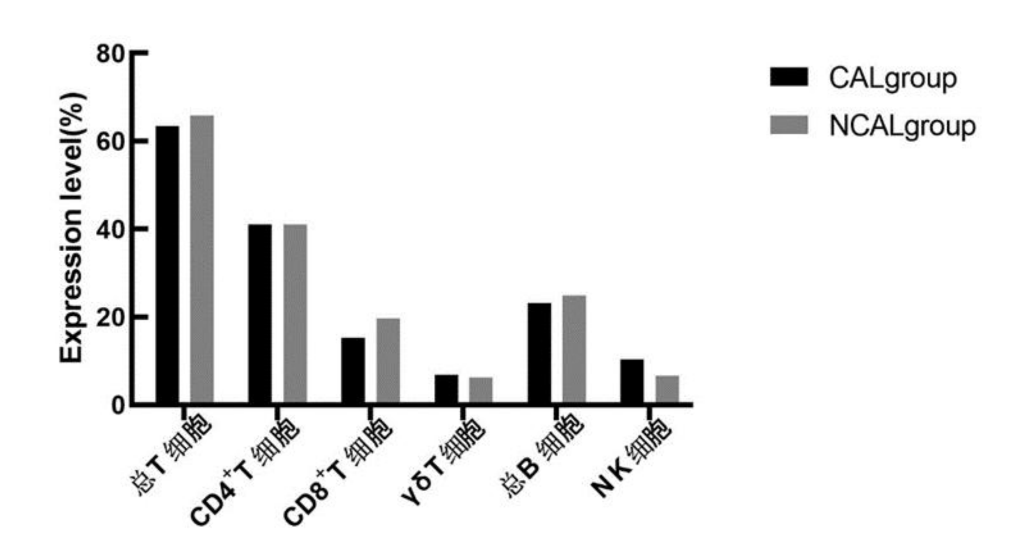



**图 4 CAL 组与 NCAL 组间淋巴细胞表达水平**

### 2.4 与 KD 发生相关因素的 Logistic 回归分析

将 KD 组与 FC 组间差异性指标纳入二元 Logistic 回归分析可知 IL-6 与 KD 发生的显著相关，IL-6 升高是 KD 发生的危险因素，有统计学意义（表 7）。

**表7 与KD发生相关因素的逻辑回归模型**

| 指标 | β | SE | Wald | P | OR | 95%CI | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | 下限 | 上限 |
| IL-4 | 0.248 | 0.219 | 1.281 | 0.258 | 1.282 | 0.834 | 1.970 |
| **IL-6** | 0.069 | 0.025 | 7.318 | **0.007** | 1.071 | 1.019 | 1.126 |
| IL-10 | 0.016 | 0.111 | 0.021 | 0.883 | 1.016 | 0.817 | 1.264 |
| IL-5 | 0.098 | 0.308 | 0.101 | 0.750 | 1.103 | 0.604 | 2.015 |
| IL-8 | -0.024 | 0.051 | 0.220 | 0.639 | 0.977 | 0.884 | 1.078 |
| 总T细胞 | 0.077 | 0.099 | 0.609 | 0.435 | 1.080 | 0.890 | 1.312 |
| $CD8^{+}$T细胞 | -0.163 | 0.096 | 2.852 | 0.091 | 0.850 | 0.703 | 1.027 |
| $CD4^{+}$T细胞 | -0.014 | 0.071 | 0.037 | 0.847 | 0.986 | 0.858 | 1.135 |
| 总B细胞 | 0.066 | 0.072 | 0.855 | 0.355 | 1.069 | 0.928 | 1.230 |
| 常量 | -4.547 | 6.488 | 0.491 | 0.483 | 0.011 | | |

### 2.5 影响冠脉损伤因素 Logistic 回归分析

将 CAL 组和 NCAL 组间差异性分析筛选出的有统计学意义的 IL-4、IL-6、IL-1β、$CD8^{+}$T

细胞和 NK 细胞变量纳入二元 Logistic 回归进行损伤影响因素筛选。经二元 Logistic 回归分析可知，$CD8^+T$ 细胞和 NK 细胞是影响冠脉损伤的重要影响因素。$CD8^+T$ 细胞每增加一个单位，损伤的危险性减少（OR=0.750,95%CI：0.611-0.921）；NK 细胞每增加一个单位，损伤的危险性增加（OR=1.652,95%CI：1.192-2.289），有统计学意义,见表 8。

**表 8 影响损伤因素的逻辑回归模型**

| 指标 | β | SE | Wald | P | OR | 95%CI | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | 下限 | 上限 |
| IL-4 | -0.208 | 0.345 | 0.365 | 0.546 | 0.812 | 0.413 | 1.597 |
| IL-6 | -0.006 | 0.004 | 2.081 | 0.149 | 0.994 | 0.987 | 1.002 |
| IL-1β | -0.055 | 0.132 | 0.175 | 0.676 | 1.057 | 0.816 | 1.367 |
| $CD8^+T$ 细胞 | -0.288 | 0.105 | 7.565 | **0.006** | 0.750 | 0.611 | 0.921 |
| NK 细胞 | 0.502 | 0.166 | 9.087 | **0.003** | 1.652 | 1.192 | 2.289 |
| 常量 | 0.989 | 1.343 | 0.543 | 0.461 | 2.689 | | |

**2.6 ROC 曲线**

经 ROC 曲线诊断可知，$CD8^+T$ 细胞预测 CAL 的 AUC 为 0.678（P＜0.05），NK 细胞预测 CAL 的 AUC 为 0.724（P＜0.05），多指标联合损伤的 ROC 曲线下面积 AUC（95%CI）值为 0.901（0.783-0.967），灵敏度为 81.25%，特异度为 94.12%，约登指数为 0.75，有统计学意义。见图 5、图 6、表 9。

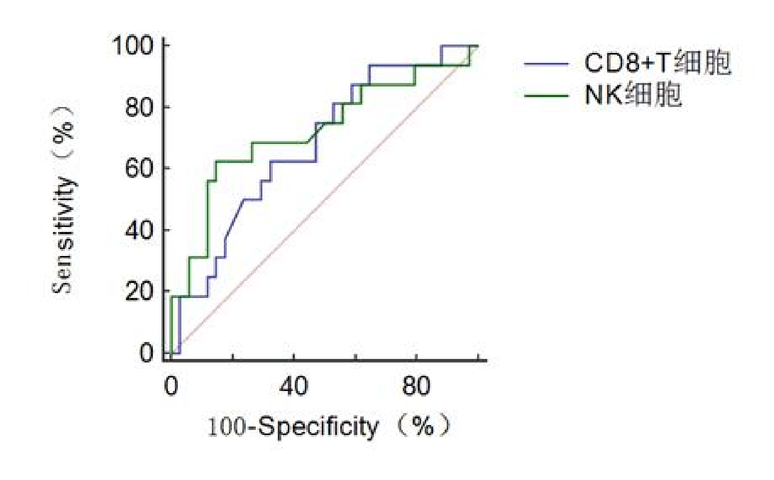



**图 5 $CD8^+T$ 细胞及 NK 细胞预测冠脉损伤的 ROC 曲线**

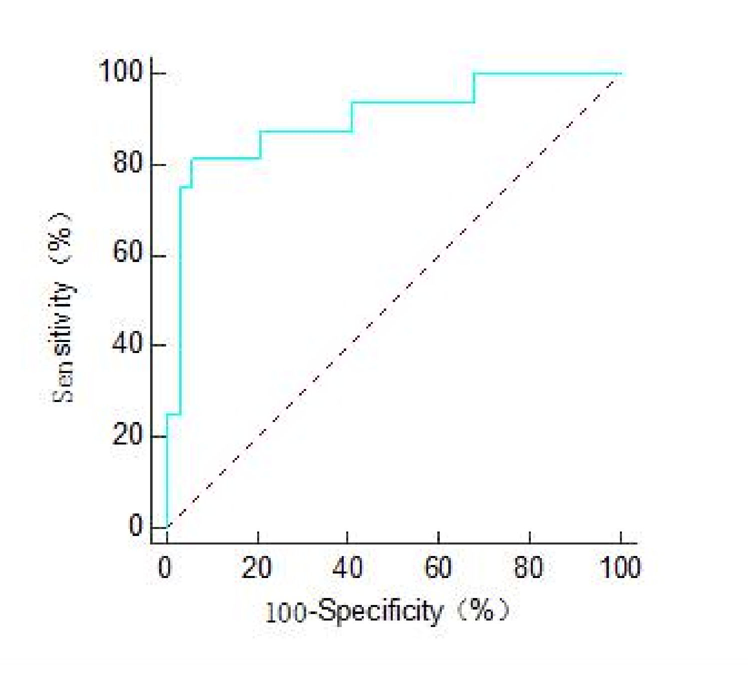



**图 6 CD8$^+$T 细胞和 NK 细胞二者联合预测冠脉损伤的 ROC 曲线**

**表 9 ROC 曲线下面积**

| 变量 | AUC | 标准误 | 渐进显著性 | 渐进 95%置信区间 | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 上限 | 下限 |
| CD8$^+$T 细胞 | 0.678 | 0.0804 | 0.044 | 0.532 | 0.803 |
| NK 细胞 | 0.724 | 0.0853 | 0.011 | 0.580 | 0.841 |
| 联合因子 | 0.901 | 0.0522 | 0.000 | 0.783 | 0.967 |

## 3 讨论

KD 是一种急性发热性系统性血管炎，未经积极治疗的患儿约 15%-25%发生 CAL。CAL 是本病最严重的并发症，可导致患儿发生冠状动脉瘤（CAA）、血栓甚至猝死。因此，KD 是儿童获得性心脏病的最常见原因[1]。目前，KD 的诊断是基于临床标准和实验室检查结果，没有特异性实验室标志物来早期鉴别 KD 和其他发热性疾病，这可能导致 KD 诊断延误。有研究表明延迟诊断是患儿发生 CAA 的唯一重要独立风险因素，CAA 风险增加与医生的延迟诊断有关，而与父母的延迟就医无关[3]。因此，探索有助于及早诊断 KD 的实验室指标对 KD 的诊疗具有重要意义。此外，联合利用多种特异性免疫标记物预测 CAL 可弥补超声心动图对预测发生 CAL 的不足。这是本研究的目的所在。

### 3.1 炎症细胞因子与 KD

川崎病是一种由超抗原(导致 T 细胞的非特异性激活，导致多克隆 T 细胞激活和广泛的

细胞因子释放的分子)引起的疾病[4]。在 KD 急性期，氧化应激反应使得后天免疫系统异常，并激活先天免疫细胞，产生一系列促炎分子，如细胞因子、趋化因子等。上述反应进一步将免疫细胞招募到动脉壁，造成血管壁的损伤。大量研究证实，免疫相关细胞因子表达和产生的异常提示局部或全身免疫功能紊乱，对 KD 的发病中起重要作用[5]。

本研究我们观察了炎症细胞因子与 KD 及 CAL 之间的密切关联。IL-4 由 T 淋巴细胞和骨髓细胞产生，并是 2 型免疫反应的标志性细胞因子[6]。IL-4 高水平和 Th2 细胞因子占据优势似乎是 KD 急性期的一个关键特征[7]。此外，CAL 患儿血清 IL-4 显著高于无 CAL 者[8]。IL-6 是一种可溶性的炎症细胞因子，它通过诱导血管内皮生长因子的过度产生，导致血管生成增强和血管通透性增加，是炎性病变的病理特征[9]。Wu 等[10]发现血清 IL-6 在 KD 急性期明显增加，IVIG 治疗后降至正常，而未发现 CAA 患儿和无 CAA 患儿间 IL-6 的明显差异。IL-10 能够抑制过度炎症反应，限制炎症引起的不必要的组织破坏。因此，IL-10 家族细胞因子在许多感染性和炎症性疾病中发挥着不可或缺的功能[11]。Zhang 等[12]在一项回顾性研究中发现，IL-10 在 KD 患儿的各种状态中表现出高敏感性的波动，且与 $CD19^{+}B$ 细胞的百分比密切相关。然而，IL-10 在有 CALs 和没有 CALs 的 KD 组之间没有显著差异[13]。最近研究表明，血浆 IL-5 水平在一些心血管疾病中发生改变，包括动脉粥样硬化和心肌缺血，可能对这些疾病的发展有潜在的调节作用[14]。Kuo 等[15]发现，在 IVIG 治疗前，KD 患儿的 IL-5 水平比对照组高。IVIG 治疗后，IL-5 水平越高则 CAL 发生率越低，IL-5 的增加与 KD 的 CAL 形成呈反比。此外，IL-8 通过与其两个受体—趋化因子受体 1（CXCR1）和 CXC 趋化因子受体 2（CXCR2）结合产生多种生物功能，包括促进炎症反应（招募中性粒细胞聚集于炎症部位）和血管生成等[16]。先前研究表明，KD 急性期 IL-8 mRNA 表达、IL-8 蛋白水平和中性粒细胞趋化活性均升高，表明 IL-8 在本病急性期会促进中性粒细胞的黏附和迁移。然而，经 IVIG 治疗改变 IL-8 水平可能抑制白细胞粘附，保护器官免受中性粒细胞介导的损伤，改善 KD 症状并降低动脉瘤形成的风险[17]。Okada 等[18]报道，IL-33/ST2 轴通过增加 HCAECs 中 IL-8 的产生参与 KD 患儿血管炎和 CALs 的发生发展。最后，IL-1β是由先天免疫细胞产生的一种强有力的促炎细胞因子，它是宿主反应和抵抗病原体必不可少的，但同时加剧了急性组织损伤[19]。有研究表明，抑制 IL-1β可减轻 KD 小鼠模型的血管炎[20]。此外，Si 等[21]发现 IL-1β的血清水平在患有 CALs 的 KD 儿童中水平显著升高。

本研究显示，与 FC 组相比，KD 患儿的炎症细胞因子 IL-4、IL-6、IL-10、IL-5 和 IL-8 的水平升高且 IL-6 是 KD 发生的独立危险因素，有统计学意义（$P<0.05$），利用以上指标对鉴别 KD 和其他发热性疾病可能具有提示意义，从而尽可能避免 KD 的诊断延误，进而有助

于避免 IVIG 治疗的延误导致的冠状动脉瘤的风险。此外，CAL 组的 IL-4 和 IL-1β水平高于 NCAL 组，这与先前报道一致，而 IL-6 水平低于 NCAL 组，这与先前研究并不一致，且尽管 IL-4、IL-1β和 IL-6 两组间均有差异，但三者均不能构成 CAL 的危险因素，对 CAL 也无预测作用，可能因本研究样本量较小且为单中心研究有关。

3.2 淋巴细胞与 KD

淋巴细胞是免疫系统的重要组成部分，先天免疫系统的免疫细胞包括中性粒细胞、单核巨噬细胞、自然杀伤细胞等，获得性免疫系统的细胞是 T 和 B 淋巴细胞。基于 T 细胞表面受体不同，将其分为 $CD4^+$T 细胞和 $CD8^+$T 细胞。传统的 $CD4^+$T 细胞形成了辅助 T（Th）细胞系，其表达的 T 细胞受体（TCR）仅限于 MHC II 类，而表达 CD8 核心受体（由 CD8α 和 CD8β异质体形成）的 T 细胞和在 MHC I 类表达背景下识别抗原的 TCR 构成细胞毒性 T 细胞系[22]。葡萄球菌和链球菌等超抗原具有激活大量淋巴免疫细胞的独特能力，可能是 KD 的病因之一。Kobayashi 等[23]对 KD 血管炎病变组织病理学研究显示，特征性 T 细胞和大量 $CD8^+$T 细胞浸润于血管病变处。然而，有报道提示 KD 患儿外周血 T 细胞活化水平较低。关于 KD 中外周血 B 细胞活化的研究结果并不一致。有研究表明，KD 患儿有多克隆 B 细胞的激活，B 细胞绝对数的增加和 B 细胞表面标记 CD23 的表达增加；然而，有研究称在 KD 的急性期，循环血液中的 IgA B 细胞减少，且在致死性 KD 中，IgA 浆细胞浸润冠状动脉管壁。另外，KD 中 NK 细胞的研究报道较少，在 KD 急性期，循环中的 $CD16^+$NK 细胞的绝对数量显著减少，尚不清楚外周血 NK 细胞数量的改变是原发性的还是继发于急性 KD 的病理状态[24]。

本研究中，比较了 KD 患儿与 FC 组间外周血淋巴细胞差异，发现总 T 细胞、$CD4^+$T 细胞和总 B 细胞的水平高于 FC 组，表明 KD 患儿体内的免疫系统紊乱，细胞免疫和体液免疫失衡，且 $CD4^+$T 细胞和 B 细胞激活参与川崎病的发病过程。然而，$CD8^+$T 细胞水平低于 FC 组甚至低于 NC 组，差异均有统计学意义，与之前的研究一致[25]。我们推测可能是因为免疫抑制因子 P（激活素 A）抑制 KD 外周 $CD8^+$T 细胞的活性[26]。本实验发现 CAL 组的 $CD8^+$T 细胞低于 NCAL 组，NK 细胞高于 NCAL 组且二者联合检测的 ROC 曲线具有良好的 AUC 和特异性。此外，二元 Logistic 回归分析提示 $CD8^+$T 细胞和 NK 细胞是 CAL 发生的危险因素，表明 $CD8^+$T 细胞减少和 NK 细胞增多对冠状动脉损害起重要作用，可作为评估 KD 患儿发生 CAL 的辅助参考依据。此前有学者研究表明 KD 合并 CAL 患儿冠状动脉壁有 $CD8^+$T 细胞浸润[27]。对这些观察结果的一个可能的解释是，从外周血重新分布到炎症部位的活化的 $CD8^+$T 细胞可能部分地造成了外周 $CD8^+$T 细胞的减少和 KD 中这些细胞的低水平活化。

综上，本研究综合阐述了炎症细胞因子和淋巴细胞在 KD 和发热患儿中的表达特征，可以辅助临床医生快速及早辨别并诊断 KD 患儿，并针对 KD 合并 CAL 患儿构建细胞因子和淋巴免疫细胞预测模型，联合 $CD8^{+}T$ 细胞和 NK 细胞能够早期准确的预测 CAL 的发生，弥补超声心动图不能及早预测 CAL 的不足，有利于患儿发生 CAL 的评估。但因本研究的样本量较少，可能是 IL-4、IL-6 和 IL-1β在预测 CAL 时无统计学意义的原因之一，可加大样本量进一步研究与验证。

参考文献

[1] Zhang D, Liu L, Huang X, et al. Insights Into Coronary Artery Lesions in Kawasaki Disease[J]. Front Pediatr, 2020, 8: 493.
[2] 马平，刘崇海，唐庆，等. 超声心动图分析冠脉损伤评估方法在川崎病冠状动脉病变的诊断价值[J]. 重庆医学: 1-7.
[3] Wilder M S, Palinkas L A, Kao A S, et al. Delayed diagnosis by physicians contributes to the development of coronary artery aneurysms in children with Kawasaki syndrome[J]. Pediatr Infect Dis J, 2007, 26(3): 256-60.
[4] Shulman S T, Rowley A H. Kawasaki disease: insights into pathogenesis and approaches to treatment[J]. Nat Rev Rheumatol, 2015, 11(8): 475-82.
[5] Chang L, Yang H W, Lin T Y, et al. Perspective of Immunopathogenesis and Immunotherapies for Kawasaki Disease[J]. Front Pediatr, 2021, 9: 697632.
[6] Ho I C, Miaw S C. Regulation of IL-4 Expression in Immunity and Diseases[J]. Adv Exp Med Biol, 2016, 941: 31-77.
[7] Assari R, Aghighi Y, Ziaee V, et al. Interleukin-4 cytokine single nucleotide polymorphisms in kawasaki disease: a case-control study and a review of knowledge[J]. Int J Rheum Dis, 2018, 21(1): 266-270.
[8] 唐政华. 川崎病患儿治疗前后血清白细胞介素-4、白细胞介素-17 和肿瘤坏死因子-α的变化及其临床意义[J]. 中国实用医刊, 2011, 38(9): 37-40.
[9] Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014, 6(10): a016295.
[10] Wu Y, Liu F F, Xu Y, et al. Interleukin-6 is prone to be a candidate biomarker for predicting incomplete and IVIG nonresponsive Kawasaki disease rather than coronary artery aneurysm[J]. Clin Exp Med, 2019, 19(2): 173-181.
[11] Ouyang W, Rutz S, Crellin N K, et al. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease[J]. Annu Rev Immunol, 2011, 29: 71-109.
[12] Zhang C, Chen L, Chen S, et al. Predictive Role of IL-2R and IL-10 in the Anti-inflammatory Response and Antiplatelet Therapy of Kawasaki Disease: A Retrospective Study[J]. Mediators Inflamm, 2022, 2022: 4917550.
[13] Su Y, Feng S, Luo L, et al. Association between IL-35 and coronary arterial lesions in children with Kawasaki disease[J]. Clin Exp Med, 2019, 19(1): 87-92.
[14] Xu J Y, Xiong Y Y, Tang R J, et al. Interleukin-5-induced eosinophil population improves cardiac function after myocardial infarction[J]. Cardiovasc Res, 2022, 118(9): 2165-2178.

[15] Kuo H C, Wang C L, Liang C D, et al. Association of lower eosinophil-related T helper 2 (Th2) cytokines with coronary artery lesions in Kawasaki disease[J]. Pediatr Allergy Immunol, 2009, 20(3): 266-72.
[16] An Z, Li J, Yu J, et al. Neutrophil extracellular traps induced by IL-8 aggravate atherosclerosis via activation NF-κB signaling in macrophages[J]. Cell Cycle, 2019, 18(21): 2928-2938.
[17] Asano T, Ogawa S. Expression of IL-8 in Kawasaki disease[J]. Clin Exp Immunol, 2000, 122(3): 514-9.
[18] Okada S, Yasudo H, Ohnishi Y, et al. Interleukin-33/ST2 Axis as Potential Biomarker and Therapeutic Target in Kawasaki Disease[J]. Inflammation, 2023, 46(1): 480-490.
[19] Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1β secretion[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2011, 22(4): 189-95.
[20] Barranco C. Vasculitis syndromes: Kawasaki disease is IL-1β-mediated[J]. Nat Rev Rheumatol, 2016, 12(12): 693.
[21] Si F, Wu Y, Gao F, et al. Relationship between IL-27 and coronary arterial lesions in children with Kawasaki disease[J]. Clin Exp Med, 2017, 17(4): 451-457.
[22] Preglej T, Ellmeier W. CD4(+) Cytotoxic T cells - Phenotype, Function and Transcriptional Networks Controlling Their Differentiation Pathways[J]. Immunol Lett, 2022, 247: 27-42.
[23] Kobayashi M, Matsumoto Y, Ohya M, et al. Histologic and Immunohistochemical Evaluation of Infiltrating Inflammatory Cells in Kawasaki Disease Arteritis Lesions[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2021, 29(1): 62-67.
[24] Matsubara T, Ichiyama T, Furukawa S. Immunological profile of peripheral blood lymphocytes and monocytes/macrophages in Kawasaki disease[J]. Clin Exp Immunol, 2005, 141(3): 381-7.
[25] Ehara H, Kiyohara K, Izumisawa Y, et al. Early activation does not translate into effector differentiation of peripheral CD8T cells during the acute phase of Kawasaki disease[J]. Cell Immunol, 2010, 265(1): 57-64.
[26] Wu Q, Weng R, Xu Y, et al. Activin a suppresses peripheral CD8(+) T lymphocyte activity in acute-phase Kawasaki disease[J]. BMC Immunol, 2021, 22(1): 17.
[27] Guzman-Cottrill J A, Garcia F L, Shulman S T, et al. CD8 T lymphocytes do not express cytotoxic proteins in coronary artery aneurysms in acute Kawasaki disease[J]. Pediatr Infect Dis J, 2005, 24(4): 382-4.